Laboratory. - Cold Spring Harbor, New York, 2001. P.132-134.

5. A. Muller, E. Silva, J. Abrantes, P.J. Esteves, P.G. Ferreira, J.C. Carvalheira, N. Nowotny, G. Thompson. // Partial sequencing of recent Portuguese myxoma virus field isolates exhibits a high degree of genetic stability.- Veterinary Microbiology 2010, Jan 6,140(1-2) P. 160-166

Контактная информации об авторах для переписки

Синдрякова И.П., аспирант, **Моргунов С.Ю.**, аспирант, **Сальников Н.И.**, аспирант, **Цыбанов С.Ж.**, д.б.н., профессор, **Колбасов Д.В.**, д.в.н., профессор

Адрес для переписки: Синдрякова Ирина Петровна Yasnen-ko@mail.ru 89051479854

УДК 663:619:576.8

Чубенко Н.В., Малышева Л.А.

(Донской ГАУ)

ПРИМЕНЕНИЕ УСКОРЕННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ

Ключевые слова: Пищевые продукты, патогенные микроорганизмы, классические и ускоренные методы анализа, сравнительная характеристика.

Введение.

Проблема выявления пищевых зоонозов, в том числе Salmonella и Listeria monocytogenes в сырье и готовой продукции по-прежнему остается актуальной. Статистика заболеваний людей пищевого происхождения, приведенная ВОЗ, регистрирует значительное увеличение в Европе заболеваний обусловленных потреблением продуктов питания, контаминированных сальмонеллами и листериями [6].

Возникновение пищевого сальмонеллеза и листериоза связано с употреблением продуктов питания (мясо и мясная продукция, молоко и молочная продукция, рыба, рыбная продукция, нерыбные объекты промысла, яйцо и яйцепродукты) прошедших недостаточную термическую обработку или их обсеменением патогенными микроорганизмами в процессе производства и хранения.

В Российской Федерации с 2002 года в СанПиН 2.3.2.1078-01 определен перечень пищевых продуктов, которые контролируются на наличие сальмонелл и листерий. Разработаны ГОСТ Р 51921-2002 и ГОСТ Р 52814-2007 в соответствии с которыми, должны проводиться исследования пищевой продукции на наличие вышеуказанных микроорганизмов [1].

Исследование продукции на наличие Salmonella и L. monocytogenes предусматривает четыре этапа: неселективное и селективное обогащение, выявление и подтверждение и имеет ряд особенностей. Одна из которых состоит в том, что в пищевых продуктах микроорганизмы родов Salmonella и Listeria находятся в смешанной форме с другими микроорганизмами и для их выявления необходимо применение селективных сред обогащения, подавляющих рост сопутствующей микрофлоры. Другая особенность заключается в выделении непатогенных для человека видов листерий, обладающих сходными с L. monocytogenes культурально-морфологическими свойствами. Например, L. innocua является наиболее часто сопутствующим микроорганизмом L. monocytogenes. В связи с этим необходимо использовать строго специфические среды и методы выявления и идентификации патогенного для человека вида листерий [7].

Окончательные результаты с использованием традиционных (классических методов микробиологических исследований пищевой продукции на наличие сальмонелл при отрицательном результате анализа могут быть получены через 4 суток, а при положительном на 5-е и 8-е (14-е) сутки соответственно. Это указывает на то, что результаты испытаний с использованием традиционных методов контроля, получают только тогда, когда продук-

ция уже реализована. Другими словами, результаты испытаний «идут в стол», т.е. без своевременного их использования применительно к исследованной партии продукции.

Такое положение можно исправить, применив эффективные ускоренные методы скрининга и идентификации патогенных микроорганизмов в пищевой продукции.

Материалы и методы.

Целью данной работы является сравнительная оценка эффективности ускоренных методов, таких как метод иммуноферментного и иммунохроматографического анализа с классическими методами при исследовании пищевой продукции на наличие патогенных микроорганизмов. В качестве материала исследований использовали 30 образцов пищевой продукции, каждый из которых был исследован в трех параллелях различными методами.

Иммунохроматографический метод с использованием экспресс-теста Singlepath в практике микробиологического контроля используют как средство скрининга (для ускоренного определения патогенных микроорганизмов), либо в качестве идентификационного теста. Поскольку нижний предел чувствительности экспресс-тестов не превышает 105 -106 бактерий / см3, их использованию должно предшествовать микробное обогащение анализируемого образца.

Неселективное обогащение. Навеску гомогенизированного образца массой 25 г. внесли в 225 мл. забуференной пептонной воды для сальмонелл и бульона Фрайзер 1 для листерий. Инкубировали в течение 21±3 ч. при температурах 37±1 ^{0} С и 30± 1^0 С соответственно.

Селективное обогащение. По окончании инкубирования 0,1 мл. обогащенной культуры внесли в 9,9 мл. среды Раппопорт-Вассилиадиса для сальмонелл и бульона Фрайзер 2 для листерий. Инкубировали 21±3 ч. при температурах 41±10 С и 37±10 С соответственно.

Инактивация. 1-2 мл. культуры, полученной после селективного обогащения, перенесли в пробирку. Данную культуру инактивировали на водяной бане при 1000 С в течение 15 минут.

Тестирование. Обогащенную инактивированную культуру охладили до комнатной температуры и отобранную пробу (160 мкл) внесли в лунки тестов Singlepath Salmonella и Singlepath L. mono. В лунке, а так же в контрольной (С) и тестовой (Т) зонах панели локализованы меченные золотом и красителем антитела. Если в образце присутствует искомый антиген, то образуется комплекс «антиген-антитело». Проходя через тестовую зону (Т) и взаимодействуя с иммобилизованными антителами, комплекс образует линию, окрашенную в красный цвет. При достижении жидкой фазы образца контрольной зоны (С) в ней образуется красная линия, свидетельствующая о нормальной работе теста и завершении анализа. Тест считается положительным, если красная линия присутствует в тестовой (Т) и контрольной (С) зонах. В случае предварительного положительного результата, выделенные культуры патогенна идентифицируют по биохимическим, морфологическим и другим признакам, определяющим их принадлежность к определенному виду бактерий согласно ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579) и ГОСТ Р 51921-2002. Отрицательный ответ является окончательным и свидетельствует об отсутствии патогенного микроорганизма в анализируемом образце [2,3,5].

Итак, иммунохроматографический метод обеспечивает существенное сокращение продолжительности анализа (позволяет получить отрицательный результат в течение 48 часов, тогда как классический 96 часов для Salmonella и 120 для L. monocytogenes, снижает трудозатраты, является высокочувствительным, специфичным, удобным, надежным тестом, используемым для скрининга микроорганизмов в продуктах питания.

Параллельно с классическим и иммунохроматографическим методами, исследования пищевой продукции на наличие патогенных микроорганизмов, проводили иммуноферментный анализ при помощи автоматического анализатора mini VIDAS с использованием тестов VIDAS ICS, VIDAS SLM, VIDAS LMO 2.

Перед проведением исследования на наличие Listeria monocytogenes проводили обогащение анализируемых образцов с использованием бульона Фрайзер в течение 24 часов. Затем по 1 см3 обогащенной культуры поместили в стерильные пробирки и прогрели при температуре (100±1)0С в течение 10 минут. Полученные субстраты в количестве по 500 мкл. поместили в незапечатанные лунки стрипов VIDAS LMO2. Стрипы поместили в анализатор.

Перед проведением исследования на наличие сальмонелл предварительное обогащение анализируемых образцов проводили с использованием забуференной пеп-

тонной воды в течение 21±3 ч. Для последующей иммуноконцентрации по 800 мкл обогащенных образцов внесли в 4-е лунки стрипов VIDAS ICS на 40 минут. Затем по 400 мкл иммуноконцентрированных образцов из первых лунок стрипов ICS перенесли в пробирки с 2 мл. ICS бульона. Посевы термостатировали при температуре $(41±1)^0$ С в течение 5 часов. После этого по 1 мл. культур, полученных после инкубации перенесли в пробирки, прогрели в течение 15 мин. на водяной бане при температуре 1000С. По 500 мкл. прогретых культур внесли в первые лунки стрипов VIDAS SLM.

В основе качественного автоматизированного определения патогенных микроорганизмов в продуктах питания лежит технология энзим-связанного иммуноферментного анализа. Система сама контролирует все стадии анализа. Через 45 мин. для VIDAS SLM и 70 мин. для VIDAS LMO2 окончательный результат распечатывается автоматически. В случае выдачи анализатором результата Negative делается заключение об отсутствии в исследуемом образце соответствующего микроорганизма. В случае выдачи результата Positive, выделенные культуры патогенна идентифицируют по биохимическим, морфологическим и другим признакам, согласно ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579-2002) и ГОСТ Р 51921-2002. Таким образом, с помощью автоматического иммуноферментного анализатора mini VIDAS предварительное заключение о наличии или отсутствии патогенных микроорганизмов можно сделать в течение суток, в то время как с использованием классических методов требуется до 8 суток [2,3,4].

Результаты.

Сравнительная характеристика классического, иммуноферментного и иммунохромотографического методов представлена в таблице.

Метод исследования	**Анализируемый показатель**	**Исследовано образцов**	**Результат исследования**		**Длительность исследования (дней)**	
			Отрицательный	**Положительный**	**Отрицательный результат**	**Положительный результат**
Классический метод	Salmonella	30	26	4	3	6
	Listeria monocytogenes	30	29	1	5	8-14
Иммуноферментный анализатор mini Vidas	Salmonella	30	26	4	1	1
	Listeria monocytogenes	30	29	1	1	1
Экспресс-тест Singlepath	Salmonella	30	26	4	2	2
	Listeria monocytogenes	30	29	1	2	2

Заключение.

Согласно данным, представленным в таблице, в ходе исследования имела место полная корреляция результатов тестов VIDAS и Singlepath с классическими методами исследования. Использование экспресс - анализов позволяет снизить затраты трудовых ресурсов на проведение анализа, обеспечивает высокую специфичность и чувствительность при обнаружении патогенных микроорганизмов, существенно сокращает продолжительность анализа.

Учитывая вышеизложенное, следует признать, что внедрение в практику ветеринарно-санитарной экспертизы ускоренных, высокочувствительных и специфичных экспресс - анализов, является одной из мер, обеспечивающей выпуск качественной и безопасной продукции.

Резюме: При исследовании 30 образцов продукции с помощью ускоренных иммуноферментного и иммунохромотографического анализов, имела место полная корреляция результатов экспресс-тестов с классическими методами исследования.

SUMMARY

At research of 30 product samples by means of accelerated immunoenzymatic and immunohromotografichesky analyses, full correlation of results of express tests with classical methods of research took place.

Keywords: Foodstuff, pathogenic microorganisms, the classical and accelerated methods of the analysis, the comparative characteristic.

Литература

1. Джефф К. Мид. «Микробиологический анализ мяса, мяса птицы и яйцепродуктов», С-Петербург., 2008 г. (перевод с англ. языка).

2. ГОСТ Р 52814-2007 (ИСО 6579-2002). Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода Salmonella, 2009. -19 с.

3. ГОСТ Р 51921-2002. Продукты пищевые. Методы выявления и определения бактерий Listeria monocytogenes , 2002.- 19 с.

4. Методы выявления бактерий рода Salmonella в пищевых продуктах с использованим анализатора Vidas/mini Vidas производства фирмы «BioMerieux», Франция. Методические рекомендации МР 11-3/278-09 М.:Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002.- 24 с.

5. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием хроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия). Методические рекомендации . № 24 ФЦ/976 М.:Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.

6. Программа ВОЗ по наблюдению и контролю за пищевыми инфекциями и интоксикациями в Европпе //Вестник ВОЗ.2004. -№80.

7. Серегин И.Г. Лабораторные методы в ветеринарно-санитарной экспертизе пищевого сырья и готовых продуктов / И.Г. Серегин.- СПб.: РАПП, 2008.- 408 с.

Контактная информации об авторах для переписки

Чубенко Надежда Владимировна, 346407, Ростовская область, г. Новочеркасск, ул. Магистральная 20, кв. 69., тел. 8-950-849-68-86

Малышева Людмила Александровна, 346421, Ростовская область, г. Новочеркасск, ул. Ветеринарная 16, кв. 5., тел. 8-863-52-266973; 8-903-436-52-92.

УДК 636.4.087.74

Острикова Э.Е.

(Донской ГАУ)

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОСТИМУЛЯТОРОВ И ПРОБИОТИКОВ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ СВИНЕЙ

Ключевые слова: пробиотики, биостимуляторы, живая масса, среднесуточный прирост

Введение

Главным фактором увеличения продуктивности молодняка свиней является биологическая полноценность их кормления, которая определяет нормальное течение ряда физиологических процессов в организме животных [2].

Все чаще в кормление свиней применяются биологически активные вещества различной природы, способствующие повышению усвоения и полезного действия корма, входящего в состав рационов

Применение биогенных стимуляторов, пробиотических препаратов способствует лучшему усвоению питательных веществ, оптимизации метаболических процессов в организме, повышению продуктивности животных, устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды [1].

Материал и методика исследований

Научно-хозяйственные опыты проводились в период с 2003 по 2010 года в условиях племзавода «Гашунский» Ремонтненского района, ЗАО «имени Ленина» Цимлянского района, КФХ «Геркулес» Матвеево-Курганского района Ростовской области на свиньях степного типа скороспелой мясной породы.

Для проведения опыта было отобрано в каждом хозяйстве по 120 голов свиней в возрасте 2 месяцев и живой массой 18-20 кг. Животных отбирали по принципу аналогов с учетом происхождения, возраста, живой массы, пола и развития. Животным, согласно схеме опыта, вводили изучаемые препараты:

- биогенный стимулятор из трутневого расплода (СИТР);
- СТЭМБ - биогенный стимулятор на основе куриного эмбриона создан в 2003 году учеными Ставпорольского ГАУ;
- проваген - Действующим началом пробиотика ПРОВАГЕН являются запатентованные и задепонированные ООО